

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO
DA CADEIA LEVE DE DINEÍNA**

Lisandra Pereira Pedro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Junho de 1.998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO
DA CADEIA LEVE DE DINEÍNA**

Lisandra Pereira Pedro

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Junho de 1.998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO
DA CADEIA LEVE DE DINEÍNA**

Lisandra Pereira Pedro

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM / /

Nota

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Jair Pereira da Cunha Júnior

Uberlândia, 24 de Junho de 1998

AGRADECIMENTOS

A Deus, Causa Primeira da existência de tudo o que existe no Universo.

A minha mãe Ana, pelos ensinamentos de amor e dignidade.

Ao Sr. Akio, pelo amparo e dedicação.

Ao Giovani, pelo carinho e paciência, inspirando-me sempre a Fé e a determinação.

Ao Prof. Foued, pelo aprendizado e incentivo.

Ao Prof. Milton, pelo apoio e incentivo.

Ao Júnior, pela dedicação, paciência e companheirismo.

A todos os meus amigos do laboratório, Leticia, Lúcia, Andréia, Pablo, Hugo, André (Ceará), Luiz, Bruno e Paula, pela amizade, auxílio e companheirismo.

Ao Prof. Luiz Ricardo e demais membros do Laboratório de Genética Molecular.

À Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico e demais membros do Laboratório de Biologia Molecular da USP de Ribeirão Preto e a Maria Cristina Ramos Costa, que me ajudaram na realização da parte inicial deste trabalho

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A cadeia leve de 10 kDa da dineína flagelar é homóloga à cadeia leve de miosina V de cérebro, além de ser uma proteína inibidora da nNOS e interagir com a proteína I κ B α que controla fatores de transcrição durante infecção viral ou reação inflamatória.

Células transformadas de *Escherichia coli* contendo o vetor pmal c² com o inserto que codifica a cadeia leve de 10 kDa da dineína flagelar de *Chlamydomonas* foram cultivadas e induzidas para produção da dlc carboxi terminal à proteína ligante de maltose (PLM-dlc). A proteína de fusão purificada pode agora ser usada para a produção de anticorpos imuno-específicos, e confecção de uma coluna de afinidade para purificar os anticorpos gerados.

A proteína de fusão também foi clivada com fator Xa e a dlc foi transferida para membranas de nitrocelulose e PVDF pela técnica de Western Blot, e detectada em filme de raio-X pelo método da quimioluminescência.

O anticorpo anti dlc também foi utilizado em estudos de interação da cadeia leve de 10 kDa em tecidos de cérebro de espécies diferentes (rato, porco, galinha) gânglio de insetos, em nematóides e até em tecido vegetal. Nenhuma marcação foi encontrada provavelmente devido a problemas de transferência dessas proteínas de baixo peso molecular.

Para otimizar os procedimentos de Western Blot e quimioluminescência, vários testes foram feitos também com o anticorpo anti-cabeça de miosina V que interagiu com homogeneizado de cérebros (rato, porco e galinha) com adrenal bovina, frações de purificação de miosina V e parótida.

Com a metodologia utilizada foi possível conseguir quantidades significativas da cadeia leve de dineína em fusão com a PLM para estudos de caracterização de função da dlc e para a produção de anticorpos imuno-específicos, além de padronizar técnicas de biologia molecular e quimioluminescência neste laboratório.

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - AS PROTEÍNAS MOTORAS.....	1
1.2 - DINEÍNAS.....	2
1.3 - MIOSINAS.....	3
1.4 - MIOSINA V.....	4
1.5 - SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO (NOS).....	6
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	10
SISTEMA DE PROTEÍNA DE FUSÃO.....	10
2.1 - MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (miniprep).....	12
2.2 - ESTOQUE DE BACTÉRIAS.....	13
2.3 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO.....	14
2.4 - PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO.....	15
2.5 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE).....	15
2.6 - CONFECCÃO DA COLUNA DE AFINIDADE.....	17
2.7 - PREPARO DE HOMOGENEIZADO DE TECIDOS.....	17
2.8 - PURIFICAÇÃO DA MIOSINA V DE CÉREBRO DE GALINHA.....	18
2.9 - WESTERN BLOT.....	19
2.10 - IMUNODETECCÃO.....	19
2.11 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	21
2.12 - CLIVAGEM COM FATOR Xa.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
3.1 - PURIFICAÇÃO PLASMIDIAL.....	22
3.2 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO E DA PLM.....	23
3.3 - TRANSFERÊNCIA E DETECCÃO DE PROTEÍNAS.....	29
4 - CONCLUSÃO.....	35
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - AS PROTEÍNAS MOTORAS

As células eucarióticas possuem uma capacidade dinâmica de mudar a organização estrutural e espacial adquirindo uma variedade de formas e de proporcionar movimentos subcelulares. Esta capacidade é proporcionada pelo citoesqueleto, uma rede complexa de proteínas que formam “trilhos” por todo o citoplasma e por proteínas motoras denominadas motores moleculares, que se movimentam sobre estes “trilhos”, transportando diferentes cargas para sítios específicos.

O citoesqueleto se divide em filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os microtúbulos são estruturas cilíndricas, ocas, formados por um arranjo helicoidal de α e β tubulinas alternadas. O microtúbulo é uma estrutura polar com uma extremidade “mais”, de crescimento rápido que está, frequentemente, próxima à membrana plasmática, e uma extremidade “menos”, de crescimento lento inseridos no centróssomo. Associados aos microtúbulos estão as MAPs (proteínas associadas aos microtúbulos) (OLMSTED, 1986). Algumas MAPs identificadas apresentam atividade motora ou ATPásica entre elas, a cinesina e a dineína. A actina é uma proteína globular (G-actina) com peso molecular de 45kDa, que polimeriza formando filamentos helicoidais não covalentes (F-actina). Os filamentos da actina associam-se às miosinas que através de um sistema de hidrólise de ATP e mudança conformacional são capazes de produzir por exemplo, a contração muscular.

As proteínas motoras também chamadas mecanoenzimas são capazes de hidrolisar ATP e transformar a energia química desta hidrólise em energia mecânica produzindo força e movimento.

As mecanoenzimas podem estar associadas aos microtúbulos como a dineína e a cinesina ou associadas aos filamentos de actina como a miosina.

1.2 - DINEÍNAS

Dineínas são motores moleculares complexos que translocam ao longo de microtúbulos. as dineínas são responsáveis pelo transporte retrógrado (da extremidade do axônio para o corpo celular) de vesículas ao longo do axônio em células neuronais. Esta é a principal distinção entre os motores de dineína e cinesina a qual participa do transporte anterógrado em neurônios (do corpo celular para o axônio). Outras funções da dineína citoplasmática incluem movimento de lisossomos e endossomos, organização celular do complexo de golgi, migração do núcleo e posicionamento do fuso mitótico. Nos cílios e flagelos a dineína provém a força requerida para o deslize dos microtúbulos que forma a base para o batimento ciliar e flagelar (KING *et al*, 1996). O segmento carboxi-terminal da molécula forma um domínio globular que interage com microtúbulos e tem atividade motora, enquanto o segmento amino-terminal é conhecido por ser uma sítio ligante de cargas. Cada dineína é composta de duas a três cadeias pesadas (domínio globular) de aproximadamente 520 kDa que contêm o domínio motor e sítios ligantes de hidrólise de atp (HOLZBAUR e VALLEE, 1994), também são compostas por um número altamente variável de cadeias intermediárias e cadeias leves (VALLEE, 1993). Recentes dados moleculares mostraram que dineínas flagelar e citoplasmática estão relacionadas e possuem cadeias intermediárias de 70 a 80 kDa que podem estar envolvidas no transporte intracelular de cargas na dineína citoplasmática. A cadeia intermediária ic74 tem sido mostrada recentemente na interação da dineína citoplasmática com um complexo denominado dinactina. a dineína citoplasmática também possui cadeias leves intermediárias de 50 a 60 kDa. A dineína flagelar contém um ou mais polipeptídeos de 8 a 30 kDa que não são encontrados na dineína citoplasmática. A dineína do flagelo de *Chlamydomonas*, por exemplo, possui 10 cadeias leves (KING *et al*, 1996). As cadeias intermediárias e cadeias leves intermediárias estão associadas com um complexo de proteínas denominado dinactina que intensifica o processo de transporte de organelas

para sítios específicos na célula. este complexo contém 10 subunidades: p150^{glued}, p135 (variante de p150 cérebro específica), p62, dinamitina (p50), proteína relacionada à actina (arp 1), actina, actina-capping α subunidade, actina capping β subunidade, p27, e p24 com uma estequiometria de 1:1:1:4:9:1:1:1:1:1. A cadeia intermediária de 74kDa de dineína citoplasmática é provavelmente ligante de cargas a serem transportadas através do curto filamento complexo p150-arp-actina. a p 150 glued tem sido sugerida como uma ponte entre microtúbulos e filamentos de actina e pode ter uma importante função emparelhando actina e microtúbulo no sistema de citoesqueleto (LANGFORD, 1995).

Através da clonagem molecular das cadeias leves de dineína denominadas Mr 8,000 e Mr 11,000 do flagelo de *Chlamidomonas* foi possível encontrar homologias entre sequências derivadas de organismos e ou tecidos sem motilidade ciliar e flagelar sugerindo que essas proteínas poderiam ter funções no citoplasma celular.(KING e PATEL-KING, 1995). Contudo, KING *et al* (1996), demonstraram que a cadeia leve de Mr 8,000 do flagelo de *Chlamidomonas* é também um componente de dineína citoplasmática de cérebro.

1.3 - MIOSINAS

As miosinas são proteínas motoras associadas aos filamentos de actina desempenhando fundamental importância no processo de motilidade celular, caracterizada por mudanças de organização estrutural e espacial das células. As miosinas participam de diversas atividades como contração muscular, movimento celular, citocinese, e transporte de organelas (WARRICK & SPUDICK, 1987)

Todas as miosinas apresentam um conservado domínio motor amino-terminal denominado cabeça, um domínio pescoço ou regulatório, seguido de um domínio cauda de estrutura e tamanho variados, dependendo da classe de miosina (MOOSEKER & CHENEY, 1995).

A mais divergente parte da molécula de miosina é a cauda, onde a homologia de sequência com as diferentes classes de miosina é mínima. A cauda é a região onde a molécula interage com a membrana das organelas.

CHENEY e colaboradores (1993) propuseram uma classificação a partir da sequência primária da cabeça das vinte e nove miosinas até então descritas em sete classes distintas, mantendo a denominação de miosinas I e II para as monoméricas e diméricas, respectivamente, e ordenando as demais de acordo com sua descoberta (ESFREÁFICO *et al.*, 1992; CHENEY *et al.*, 1993).

Devido a uma grande variedade de miosinas identificadas, foram agrupadas em uma superfamília composta de treze classes (COPE *et al.*, 1996). Destas treze classes, pelo menos sete são expressas em vertebrados, incluindo as chamadas não convencionais, classe I, V, VI, VII, IX, e X (HASSON & MOOSEKER, 1996; MOOSEKER & CHENEY, 1995).

1.4 - MIOSINA V

As miosinas da classe V foram originalmente descobertas em camundongos (MERCER *et al.*, 1991), leveduras (JONHSTON *et al.*, 1991); e galinha (ESPREÁFICO *et al.*, 1992). Mais recentemente foi identificado o produto do gene *myo4*, em levedura (HAARER *et al.*, 1994), a proteína *myr6* de rato (miosina-Vb (ZHAO *et al.*, 1996) e a **mioxina**, de cérebro humano, cuja sequência parcial foi publicada recentemente (ENGLE & KENNETT, 1994).

A miosina V apresenta como característica estrutural três domínios principais denominados: cabeça, pescoço e cauda. As duas cabeças amino-terminais constituem o domínio motor e sítios de ligação a ATP e actina. O domínio pescoço ou regulatório, apresenta seis repetições do motivo estrutural IQ que são sítios de ligação de múltiplas cadeias leves de calmodulina. O domínio cauda consiste de uma região proximal de α -hélice dupla responsável pela dimerização da molécula de miosina V; uma região medial onde α -hélice é alternada por dois segmentos globulares e, finalmente, uma região distal ou globular, que não possui similaridade de sequência com as outras classes de miosina, porém é a mais conservada entre os membros da classe V. A função do domínio cauda (porções medial e globular) é ainda desconhecida, mas acredita-se estar envolvida na

interação das miosinas V com outras proteínas (MOOSEKER & CHENEY, 1995; LARSON, 1996).

Estudos de sequenciamento realizado por ESPÍNDOLA *et al.* (1996) mostraram que a miosina V de cérebro (BMV) tem, além de calmodulina, cadeias leves de 17kDa e 23kDa homólogas à cadeia leve de miosina II e uma cadeia leve de 10kDa que, pela comparação da sequência, é homóloga a cadeia leve de dineína a qual tem sido identificada em *Chlamydomonas* e *Drosophila* (DICK^a *et al.*, 1996). Baseado em mapeamento por clivagem proteolítica, esta cadeia leve de 10kDa (dlc) interage com a cauda da BMV (ESPÍNDOLA *et al.*, 1996).

Esta cadeia leve altamente conservada dividida por dineína e miosina V forma uma estrutura homodimérica paralela. Análises da estrutura da molécula (figura 1) revelaram uma hélice anfifílica (resíduos 14-32) como suficiente para causar a dimerização. Um segundo segmento em hélice é capaz de realizar reação cruzada com o reagente DFDNB (resíduos 33-46) e o segmento amino-terminal (resíduos 1-13) contribui para estabilização do dímero (BENASHSKI *et al.*, 1997).

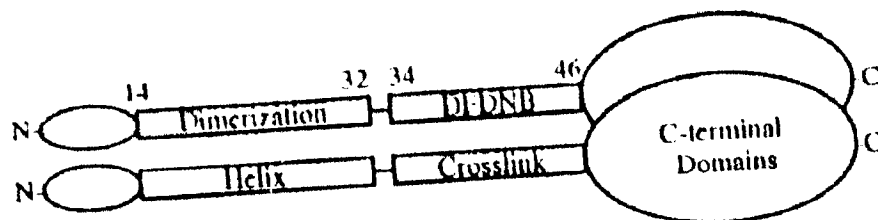


Figura 1 - Estrutura da cadeia leve de dineína (BENASHSKI *et al.*, 1997)

A análise da sequência dessa cadeia leve revela que ela é uma das proteínas mais conservadas que se conhece até o presente. Sua mutação é letal para formação do embrião de *Drosophila* (DICK *et al.*, 1996 e PHILIS *et al.*, 1996). Entretanto, a mutação da primeira cadeia leve de dineína, não metazoária, identificada em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SLC1) não provocou nenhuma alteração no crescimento vegetativo nas células de levedura (DICK^b *et al.*, 1996), sugerindo que esta cadeia leve pode desempenhar diferentes funções nas células eucarióticas de acordo com a escala evolutiva.

Recentemente, a dlc foi encontrada como um dos clones que interagem com a proteína inibidora I κ B que controla a atividade do fator de transcrição NF- κ B mantendo-o inativo no citoplasma. Este fator ativa genes envolvidos em respostas imunológicas como citocinas, receptores de superfície, moléculas de adesão e diferenciação de linfócitos e também em retrovirose humanas como HIV-1. Estudos com imunofluorescência e microscopia confocal mostraram que I κ B α e dlc colocalizam com uma distribuição citoplasmática e nuclear e também foram encontrados em associação com o centro organizador de microtúbulos podendo indicar uma possível função da dlc no tráfego nucleocitoplasmático do I κ B α em interação com o citoesqueleto ou um mediador na interação I κ B α /NF- κ B (CRÉPIEUX *et al.*, 1997 e HISCOTT *et al.*, 1997)

JAFFREY & SNYDER (1996) revelaram que esta cadeia leve de dineína também é homóloga à proteína inibidora da isoenzima neuronal da sintase do óxido nítrico (PIN). Análises desta proteína revelaram que esta desestabiliza o dímero da sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) provocando a dissociação desta em uma forma monomérica inativa. Esta descoberta foi surpreendente, porque o óxido nítrico é um gás neurotransmissor, que não pode ser estocado em vesículas como os outros neurotransmissores conhecidos e, portanto, sua síntese deve ser fortemente regulada *in vivo*.

1.5 - SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO (NOS)

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro com uma ampla função biológica como a regulação do tônus vascular, neurotransmissor, respostas imunológicas, além de ativação de fatores de transcrição, tradução, mutagênese e outras (NATAN e XIE, 1994). Também é um regulador fisiológico da respiração mitocondrial e atividades genéticas (WOLF, 1997).

Uma superprodução do NO pode levar à morte celular e causar distúrbios celulares induzidas por hipóxia, enxaqueca, demência (AIDS), Mal de Parkinson, Síndrome de Alzheimer's, Mal de Huntington e esclerose miotrófica lateral. (WOLF, 1997 e BRENMAN *et al.*, 1997). Um aumento da expressão de PIN foi identificado após uma isquemia cerebral em regiões do cérebro onde a atividade de nNOS se mantida leva à morte de células neuronais (GILLARDON *et al.*, 1998)

O óxido nítrico derivado neuronal pode ser maléfico ou benéfico dependendo do contexto celular e, portanto, precisa ser bem regulado. Um tipo de regulação envolve a síntese de numerosos *splicing alternativos* juntamente com uma diversidade de promotores que contribuem para um complexo padrão de controle da expressão de nNOS permitindo a criação de moléculas com diferenças enzimáticas e estruturais (BRENMAN *et al.*, 1997).

A sintase do óxido nítrico é uma enzima homodimérica que catalisa a oxidação da L-arginina para citrulina e formação do óxido nítrico numa forma dependente de NADPH, oxigênio molecular e vários cofatores (FNN, FAD, tetrahidroproteína). A NOS é composta por dois domínios distintos, o domínio carboxi-terminal redutase e o domínio amino-terminal oxigenase. (WOLF, 1997)

Três isoformas de NOS foram identificadas até agora:

I- nNOS (isoforma neuronal) – identificada inicialmente em células neuronais está presente no sistema nervoso central e periférico e também em músculo esquelético, neutrófilos, ilhotas pancreáticas e outros.

II- iNOS (isoforma indutível) – expressada em macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer, hepatócitos, e em resposta a endotoxina e citocinas inflamatórias.

III- eNOS (isoforma endotelial) – clonada inicialmente de células endoteliais, mas também expressa em neurônios (Nathan e Xie, 1994).

A atividade de NOS I e III é dependente de íons cálcio livres e de calmodulina (WOLF, 1997).

Análises genéticas e bioquímicas sugerem que PIN interage com um curto trecho de aminoácidos (aa 163 – 245) que são únicos na região amino-terminal de nNOS e estão ausentes em iNOS e eNOS. Este trecho corresponde ao domínio de dimerização da molécula de nNOS (JAFFREY E SNYDER, 1996).

A região de nNOS que interage com a cadeia leve (resíduos 163-245) possui um segmento anfifílico que pode contribuir para a dimerização de nNOS. Isto sugere que a cadeia leve age sobre nNOS através da ligação da hélice de dimerização anfifílica com o domínio similar de nNOS (BENASHSKI, *et al.*, 1997).

GREENWOOD *et al.* (1997), investigaram a distribuição e correlação de PIN e nNOS em várias regiões do cérebro de ratos. Identificaram uma forte expressão de nNOS em cerebelo, moderada expressão em córtex cerebral, medula, hipocampo e medula espinhal, enquanto que PIN foi mais expressada em córtex, medula e hipocampo do que em cerebelo e medula espinhal, sugerindo que PIN pode ter outras funções além da inibição de nNOS no cérebro.

Segundo KING *et al.*, (1996), a cadeia leve de dineína denominada Mr, 8,000 é uma sequência extremamente conservada podendo sugerir que essa sequência possui uma importante função tanto no flagelo como no citoplasma.

A descoberta feita por ESPÍNDOLA *et al.* (1996) de que a cadeia leve de dineína é uma subunidade de BMV que interage com a cauda, torna extremamente interessante investigar com que subdomínio específico essa cadeia leve está interagindo e se esta interação afeta a possível função de transporte de carga desse domínio cauda. Portanto, a produção de anticorpos domínio-específicos contra esta cadeia leve é de fundamental importância no estudo dessa interação através de ensaios de imunoprecipitação, overlay e imunodeteção.

O esclarecimento da associação dessa cadeia leve com a cauda de BMV poderá ser importante na elucidação da interação da miosina com a carga que é transportada. Além disso, o fato de BMV e dineína compartilharem a mesma cadeia leve sugere uma função comum para essa proteína no transporte de vesículas e organelas pelos motores de microtúbulo e actina.

A produção de anticorpos específicos contra a cadeia leve de 10kDa da miosina V também deve desempenhar grande importância em estudos que elucidam a função desta proteína no transporte de melanossomos.

O Presente trabalho tem como objetivo expressar a cadeia leve de dineína de 10kDa (dlc) em fusão com a proteína ligante de maltose (PLM), purificar a proteína de fusão em coluna de afinidade amilose-sepharose. Padronizar protocolos em nosso laboratório de técnicas de Biologia Molecular, de transferência Western blot e de detecção por quimioluminescência.

A proteína de fusão purificada poderá ser usada para a produção de anticorpos domínio específicos a serem usados como sondas de detecção, imunolocalização e imunoprecipitação em futuros estudos de interação com a cauda de miosina V e subdomínios cauda proximal, medial e distal; estudar a interação com tecidos animais variados (cérebro, fígado, glândulas, etc), com outras proteínas do citoesqueleto; com tecidos vegetais e gânglios de invertebrados.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

SISTEMA DE PROTEÍNA DE FUSÃO

As novas técnicas de biologia molecular são de fundamental importância para a bioquímica, no estudo de estrutura e função de proteínas. O sistema de purificação utilizado neste trabalho consiste num método em que o gene da proteína de interesse é clonado num plasmídeo vetor *pMal*, em fusão com o gene *malE* que codifica a proteína ligante de maltose (PLM). Este vetor é transformado em *Escherichia coli* que quando induzida em cultura líquida, expressa a PLM e a proteína em fusão para o citoplasma. O extrato celular é aplicado em coluna de afinidade com a amilose, e a proteína de fusão é purificada em apenas um passo de purificação ficando retida na coluna enquanto as outras proteínas fluem. A proteína de fusão é então eluída com maltose na forma purificada e a proteína de interesse pode ser agora separada da PLM pela protease denominada fator Xa devido a um sítio de clivagem no vetor localizado no sítio de inserção. A proteína de interesse pode ser obtida pura aplicando-se a fração clivada novamente em coluna de amilose (RIGGS *et al.*, 1990). A figura 2 mostra um esquema do método de proteína de fusão utilizado neste trabalho.

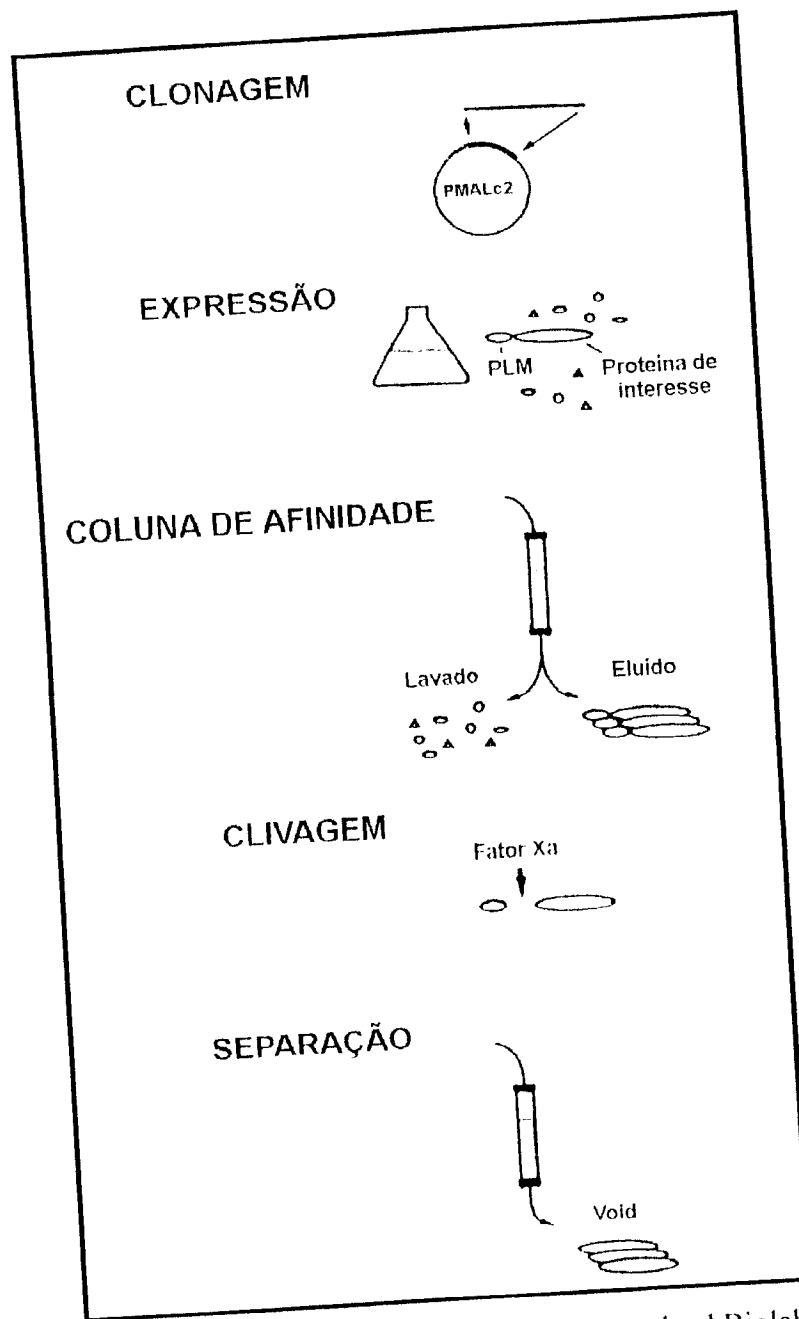


Figura 2 – sistema de proteína de fusão (New England Biolabs)

A cadeia leve de dineína de 10 kDa utilizada no presente estudo foi obtida como uma proteína em fusão com a proteína ligante de maltose (PLM). Para isto, a região codificadora foi clonada nos sítios XmnI e XbaI do vetor pMal-c² (New England Biolab). Este constructo foi cedido pelo Dr. S. King da University of Connecticut Health Center,

Farming, Connecticut. O plasmídeo foi transformado em *Escherichia coli* cepa XLI-BLUE.

2.1 - MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (miniprep)

Uma colônia de *E. coli* XLI-blue contendo plasmídios pmal-c² foi inoculada em 25 ml de meio de cultura LB contendo ampicilina e tetraciclina e a cultura foi incubada sob agitação de 180 rpm, a 37° para crescimento, até atingir DO_{600nm} de 1,0 a 1,5, as células foram então centrifugadas a 6000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi utilizado para purificação do plasmídeo através do **Kit QUIAGEN-TIP 100** segundo o protocolo do fabricante: ressuspendeu-se o precipitado bacterial em 4ml do tampão P1 (Tris-HCl 50mM pH 8,0, EDTA 10 mM Rnase 100µg/ml a 4°C) e adicionou-se 4ml do tampão P2 (NaOH 200mM, SDS 1% a temperatura ambiente) misturando-se suavemente por inversão do tubo que depois foi encubado no mesmo tampão por 5 min a temperatura ambiente. O SDS solubiliza os fosfolipídeos e proteínas componentes da membrana da célula, levando à lise e diminuição do conteúdo da célula. O NaOH desnatura os DNAs cromossomal e plasmidial, bem como proteínas. Após a lise, foram adicionados 4ml do tampão P3 (acetato de potássio 3M pH 5,5) resfriado para neutralizar a solução, agitou-se gentilmente o tubo e encubou-se no gelo por 15 minutos. A alta concentração de sal causa a precipitação do SDS, e as proteínas desnaturadas, DNA cromossomal e debris celulares tornam-se presos ao complexo sal/detergente. O DNA plasmidial sendo menor, renatura e permanece em solução. Esta solução foi então centrifugada a 20.000x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 20.000x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e reservou-se uma alíquota de 125µl para análise em gel (**amostra 1**). O sobrenadante foi aplicado na coluna QUIAGEN previamente equilibrada com 4ml do tampão QBT (NaCl 750mM, MOPS 50mM pH7,0 etanol 25% e triton X-100) e retirou-se uma alíquota de 125µl do void para análise em gel (**amostra 2**). As condições salinas e de pH do lisado e a superior seletividade da resina QIAGEN asseguram que apenas o DNA plasmidial seja retido enquanto RNA degradado, proteínas celulares, e metabólicos não são retidos. A coluna foi então lavada com dois volumes de

10ml do tampão QC (NaCl 10mM, MOPS 50mM pH 7,0 e etanol 15%) e uma alíquota de 500µl do lavado foi retirada para análise em gel (**amostra 3**). O DNA foi eluído da coluna com 5ml de tampão QF (NaCl 1,25mM tris-HCl pH 8,5 e etanol 15%) e uma alíquota de 100µl foi retirada para análise em gel (**amostra 4**). Analisou-se a purificação, precipitando cada amostra 1 - 4 com 0,7 volumes de isopropanol a 15.000x g por 30 minutos a 4°C e retirando-se cuidadosamente o sobrenadante. O mesmo procedimento foi feito com todo DNA eluído. As amostras (1-4) e todo o DNA eluído (**amostra 5**) foram então lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 10 µl de tampão TE (Tris-HCl pH 8,0, EDTA 1mM). Em cada poço do gel foram aplicados 2 µl da amostra e 0,4 µl de tampão da amostra (Bromofenol Blue 0,25% e sacarose 40%). A integridade a pureza e o rendimento do DNA obtido , foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi feita em mini-géis de agarose de concentração única 1%. A agarose foi fundida em tampão TBE 10X concentrado (tris-base 0,54%, ácido bórico 0,28%, EDTA 1 mM), fundida em forno microondas e despejada sobre uma placa horizontal (sistema BIO RAD) devidamente vedada. Após a solidificação da agarose, a placa foi transferida para uma cuba do mesmo sistema contendo tampão TBE (tris-borato 0,045mM, EDTA 0,001mM).

2.2 - ESTOQUE DE BACTÉRIAS

3 ml de meio LB (Bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,4) com ampicilina 100µg/ml e tetraciclina 12,5µg/ml foram inoculados com uma colônia de bactérias, através de uma alça de platina. O frasco foi mantido por agitação (250 rpm) por 12 a 14 h, a 37°C. Aliquotas de 500µl tura foram colocadas em tubos Eppendorf estéreis e foram adicionados 250µl de glicerol 70% estéril. Os tubos foram armazenados a -70°C.

2.3 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO

A expressão da cadeia leve de dineína em fusão com a proteína ligante de maltose foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fornecedor (New England Biolabs), com algumas modificações : 1 l de meio LB estéril contendo 0,2% de glicose e os antibióticos ampicilina (100 µg/ml) e tetraciclina (12,5µg/ml) foi inoculado com 10 ml de cultura líquida crescida durante a noite no mesmo meio a 37°C. A cultura foi mantida sob agitação a 37°C e aeração até atingir uma DO 600 nm de cerca de 0,5. Neste ponto, foi retirado 1ml da cultura, as células foram coletadas por centrifugação e preparadas para SDS-PAGE (células não induzidas). À cultura remanescente foi adicionado o indutor IPTG (isopropiltiogalactosídeo) para a concentração final de 0,3mM e a incubação foi mantida por mais 2h. Ao final deste intervalo, novamente foi retirado 1 ml para SDS-PAGE (células induzidas). A cultura foi então centrifugada a 4000 x g por 30 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado a -70°C durante a noite. O precipitado foi então ressuscitado em 10 ml de tampão de lise (tris-Hcl 100mM pH 8,0, EGTA 10mM, EDTA 10mM, sucrose 100mM , pefabloc ou PMSF 2mM, e adicionados 0,2mg/ml de lisozima no momento do uso. As células foram então incubadas no gelo por 10 a 15 min e foram adicionados 40 ml de tampão detergente para uma concentração final de 50 ml (tris-HCl pH 8,0, sarkosyl 0,4%, DTT 1mM, EDTA 1mM, ATP 0,5mM, PMSF 0,3mM) e esta solução foi homogeneizada suavemente em potter no gelo. Posteriormente, as células foram lisadas por ultrasonicação por 4 min. Após a lise as células foram centrifugadas a 30.000 x g por 30 min. a 4°C e uma amostra de 100µl do precipitado e do sobrenadante foram retirados para SDS-PAGE. Ao sobrenadante à temperatura ambiente foi adicionado 20mM de tris-Hcl pH 8,0, 0,5mM de DTT, 0,25 mM de ATP, 0,5 mM de EDTA, 1,0 mM de pefabloc e 4% de triton x-100 (1:1).

Para a expressão da proteína ligante de maltose este mesmo método foi utilizado.

2.4 - PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO

A cadeia leve de dineína em fusão com a PLM foi purificada através de uma coluna de amilose acoplada à Sepharose (New England Biolabs) de aproximadamente 4 ml, equilibrada em tampão de equilíbrio (tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl, 0,2 M, 2-mercaptoetanol 10mM ou DTT 2mM, EGTA 1mM e 0,02% azida sódica (NaN₃). 30ml do sobrenadante resultante da expressão da proteína de fusão foi aplicado à coluna à temperatura de 4°C. A coluna foi lavada inicialmente em 20 ml tampão de lavar 1 (tampão de equilíbrio + 0,1 M de NaCl) e posteriormente em 20 ml tampão de lavar 2 (igual ao tampão de equilíbrio). A proteína de fusão foi eluída em tampão de eluição (tampão de equilíbrio contendo 15mM de maltose). O perfil cromatográfico foi analisado no espectrofotômetro a 280 nm e por SDS-PAGE.

Para a purificação da PLM este mesmo método foi utilizado.

2.5 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético foi analisado por SDS-PAGE, utilizando o sistema de tampão descontínuo proposto por Laemmli (Laemmli e Favre, 1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973). Foram utilizados minigéis de dimensões 8,3 x 4,7 x 0,05cm (sistema Hoefer), com gradiente de acrilamida de 5 a 24% no gel de separação e 3% no gel de empilhamento. Os géis de separação foram preparados com glicerol 0,7%, Tampão de separação 360mM pH 8,8 (tris-base 45,38%, HCl 6N 10%), SDS 10% 0,144%, acrilamida/bisacrilamida (30:0,8) nas devidas concentrações, TEMED 0,003%, persulfato de amônio (PSA) 0,0128%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 124 mM pH 6,8 (tris-base 15,32% e HCl 12N 10%), SDS 0,12%, acrilamida:bisacrilamida (30:1,6) a 3%, TEMED 0,006% e PSA 0,150%.

As amostras foram preparadas mantendo a proporção de 100 µl de proteína, para 10 µl de tampão de amostra 10 X concentrado (SDS 8,75%, sacarose 20%, tampão de empilhamento 31 mM, β-mercaptoetanol 19%, EGTA-K 11 mM, bromofenol

blue 0,25%), fervidas por 2 minutos. Foram aplicados na máximo 10 μ l em cada poço do gel.

A eletroforese foi realizada em cubas Hoefer contendo tampão eletrodo (tris 100 mM, EDTA 7,8 mM, Glicina 770 mM, SDS 3% pH 8,3). A corrida foi iniciada com 20 mA de corrente até a entrada no gel de separação e depois aumentou-se a corrente para 30 mA. O gel foi corado em solução corante (coomassie brillant blue R, 0,125%, metanol 50%, ácido acético 1%) por 1 hora e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%), até o fundo do gel ficar transparente. Os géis foram então reservados em ácido acético 7%.

As tabelas I e II mostram os padrões de peso molecular utilizados (Sigma).

PROTEÍNAS	MIGRAÇÃO
Cadeia pesada da miosina II de músculo esquelético	200.000
β -galactosidase	116.000
Fosforilase B	97.000
Soroalbumina bovina	66.000
Ovoalbumina	45.000
Anidrase carbônica	29.000
Calmodulina	17.000

Tabela I - Proteínas do padrão de peso molecular SDS-6H Sigma e migração relativa.

PROTEÍNAS	MIGRAÇÃO
α -2 macrogobulina	193.000
β -galactosidase	112.000
Frutose-6-fosfato cinase	86.000
Piruvato cinase	70.000
Fumarase	57.000
Desidrogenase láctica	39.500
	Triosefosfato isomerase

Tabela II - Proteínas do padrão de peso molecular SDS 7B Sigma e migração relativa.

2.6 - CONFECCÃO DA COLUNA DE AFINIDADE

Para a confecção da coluna de afinidade X- sepharose 4B, 1g do gel seco de resina de sepharose 4B ativada com CNBr (Sigma) foi hidratada (inchada) com 200 ml de HCl 1mM em um bequer, sob agitação lenta através de um bastão de vidro, durante 15 minutos. Em seguida o gel foi transferido para um funil de placa sinterizada, previamente lavado com HCl concentrado, e lavado 5 vezes com HCl 1mM e 3 vezes em tampão de acoplamento (Bicarbonato de sódio 0,1M pH 8,3 e NaCl 0,5M). A resina foi transferida para uma coluna de vidro e incubada com frações eluídas da coluna de amilose sepharose, (contendo a proteína de fusão purificada) por uma noite a 4°C sob agitação orbital. Após o acoplamento a resina foi bloqueada com 3 volumes de etanolamina 1M pH 9,0 por 2 horas sob agitação orbital à temperatura ambiente. A coluna foi então lavada com 5 volumes de tampão acetato de Sódio 0,1 M pH 4,0 com NaCl 0,5M e com mais 5 volumes de tampão de acoplamento. Em seguida a coluna foi equilibrada com 5 volumes de TBS contendo 0,02% de azida sódica (NaN_3) e armazenada a 4°C.

2.7 - PREPARO DE HOMOGENEIZADO DE TECIDOS

Para o preparo de amostras de homogeneizado de tecidos para eletroforese, uma pequena amostra do tecido em estudo foi transferida para um recipiente contendo nitrogênio líquido. O tecido foi então macerado e transferido para um tubo eppendorf mantido no gelo contendo 0,5 ml de TCA 5% (ácido tricloroacético) e homogeneizado com uma microsonda (OMNI-MIXER). O volume do homogeneizado foi dividido em metades iguais, que foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C. Um dos precipitados foi ressuscitado em 500 µl de tris-HCl 100mM pH 8,8 para dosagem de proteína. O outro precipitado foi ressuscitado em 500µl de tampão da amostra 1X concentrado. Após a dosagem de proteína a amostra foi diluída em tampão de amostra 1X concentrado para uma concentração de proteína de 1 mg/ml e aliqüotadas em volume de 100 µl.

As amostras de homogeneizado foram aplicadas à uma concentração de 20µg de proteína por poço no gel.

2.8 - PURIFICAÇÃO DA MIOSINA V DE CÉREBRO DE GALINHA

O método de purificação utilizado foi o mesmo descrito em Cheney *et al.* (1993), exceto com algumas modificações. Foram homogeneizados 120g de cérebros de pintainhos congelados em 500ml de tampão pH 7,7, contendo HEPES 40mM, EDTA 5mM, ATP 5mM, DTT 2mM, PMSF 1mM, Benzamidina 1mM, Aprotinina 1 mM utilizando homogeneizador Omnimixer por 4 vezes com intervalo de 1 minuto, sempre no gelo e centrifugados a 40.000xg por 20 minutos. O precipitado enriquecido com miosina V foi ressuspenso em 50ml de tampão pH 7,2 contendo HEPES 25mM, EDTA 2mM, EGTA 2 mM, DTT 2 mM. Adicionou-se então Triton x-100 para 1% e solubilizou-se as membranas do precipitado centrifugado a 40.000xg por 20 minutos. A miosina V foi solubilizada desse precipitado em 8ml de tampão S-500 pH 8,3 com 10mM de ATP, HEPES 25mM, NaCl 0,6M, MgCl₂ 5mM, EGTA 2mM, DTT 2mM e ATP 5mM. Foi realizada novamente uma centrifugação a 70.000xg por 30 minutos formando um precipitado contendo F-actina e proteínas associadas. O sobrenadante foi então aplicado a uma coluna de filtração em gel S-500 (1,5 x 100cm) e fluxada durante a noite em tampão S-500 onde eram coletadas 100 gotas por tubo em um fluxo 1 x 6 da bomba P-100 da Pharmacia.

As frações da coluna S-500 foram analisadas em SDS-PAGE. Foi feito um pool das frações de miosina V e diluídas em 2 volumes de tampão Q-Sepharose pH 7,55 contendo Trictanolamina 20mM, EGTA 1mM, DTT 2mM sem sal. Este pool foi aplicado em uma coluna de troca iônica TMAE de volume 3ml pré-equilibrada em tampão Q-Sepharose agora com 250mM de NaCl. A coluna foi lavada e eluída em gradiente de 250 a 750mM de NaCl em tampão Q-Sepharose. As frações eluídas dessa coluna foram analisadas em SDS-PAGE. As frações contendo miosina V foram reunidas e dialisadas durante a noite em tampão Z' pH 7,4 (imidazol 10mM, KCl

75mM, MgCl₂ 2,5mM, DTT 2mM, EGTA 1mM na primeira diálise e 0,1mM nas outras trocas de tampão).

As frações foram lidas em espectrofotômetro a 280nm para calcular a concentração de proteínas.

2.9 - WESTERN BLOT

A técnica de eletrotransferência de proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana, conhecida como *western blotting*, combina a capacidade de resolução da proteína separada por eletroforese com a especificidade da identificação imunológica num processo rápido e altamente sensitivo. Esta técnica é basicamente nova e foi originalmente descrita por TOWBIN et al (1979), desde então o Western blotting tem se tornado um método altamente popular e conveniente para a análise e caracterização de proteínas. As proteínas que estão agora imobilizadas na membrana podem ser incubadas com anticorpos específicos que serão detectados por moléculas secundárias, geralmente anticorpos anti-IgG conjugados a enzimas.

As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose ou PVDF (polivinilideno difluor) segundo Towbin *et al.*(1979).) O tampão de transferência (eletroblot) foi preparado com tris-Hcl 25mM pH 8,3, glicina 192mM e metanol 20 a 40 %. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau 0,5% (em ácido acético 1%) por 2 a 3 minutos para visualização das bandas, descoradas com água mili Q., secas com papel de filtro à temperatura ambiente e reservadas a 4°C.

2.10 - IMUNODETECCÃO

O estágio final da localização da proteína na membrana é o passo de detecção que pode ser por autoradiografia, quimioluminescência, ou através da visualização de um precipitado colorido. A primeira geração de sistemas de detecção foram anticorpos radioativos a proteína A radioativa. No entanto, nos últimos anos, tem havido um

gradual decréscimo do uso de radioisótopos, desde que outros métodos alternativos têm sido utilizados sem comprometer a sensibilidade da detecção radioativa.

A Quimioluminescência é a mais nova técnica de detecção e tem sido amplamente utilizado devido ao fato de oferecer inúmeras vantagens sobre os métodos já conhecidos. Nesta técnica de detecção o anticorpo secundário é geralmente conjugado com peroxidase alcalina (POD), esta enzima na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalisa a oxidação do diacilhidrazida cíclico como o luminol. Imediatamente após a oxidação, o luminol está num estágio excitado e quando volta para o estágio inicial, ocorre a emissão de luz que é detectada num filme de raio-X. Certos compostos podem ser adicionados à reação para aumentar a emissão de luz. Com a detecção do sinal num filme de raio-X tem-se um arquivo permanente o qual não irá se desfazer com o tempo ou com a exposição à luz como ocorre com outros tipos de detecção. As membranas reveladas por quimioluminescência ainda oferecem a vantagem de ser capaz de reutilizar as membranas com diferentes anticorpos, permitindo então que a membrana seja utilizada várias vezes (ROSENBERG, 1996).

As membranas de nitrocelulose ou PVDF foram bloqueadas durante a noite (overnight) a $4^\circ C$ ou por 5 horas a temperatura ambiente em solução de bloqueio (leite desnatado 5%, TBS pH 8,0 tween 20 0,05%). Em seguida lavadas em solução TBS/Tween por 3 vezes de 5 minutos cada e incubadas com o anticorpo primário apropriado. por 1 hora sob agitação ou overnight a $4^\circ C$, lavadas em solução TBS/tween 3 vezes de 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário IgG POD por 45 minutos a uma hora. Após a reação com o anticorpo secundário as membranas foram novamente lavadas em TBS/Tween por 2 vezes de 5 minutos cada e por 5 minutos em tampão carbonato 0,2 M pH 9,6 :sol. A - Na_2CO_3 21,198g/ml; sol. B - $NaHCO_3$ 16,802 g/l .Adicionar 100 ml da solução B para 60 ml de A até acertar o pH para 9,6, (BISARIO, 1997). A reatividade dos anticorpos foram detectadas pelo sistema de quimioluminescência segundo o protocolo do fabricante (ECL; Amersham Corp): a membrana é incubada com solução de detecção (solução A e B 1:1) por 1 minuto, rapidamente colocadas sobre um filme de PVC com a face contendo as proteínas virada para baixo, embrulhada, e colada com fita adesiva dentro de um cassete de revelação com a face certa virada para cima. O filme de raio-X foi então colocado sobre a membrana

cuidadosamente, o cassete foi fechado e o tempo de revelação utilizado foi de 1 a 10 minutos. O filme foi então mergulhado em solução de reveladora (Kodak) por 1 minuto, lavado em água e fixado em solução fixadora (Kodak). foram colocados pontos de tinta fluorescente dentro do cassete como marcadores da posição da membrana. A partir do momento que foi colocada a solução de detecção todos os procedimentos foram feitos no escuro ou com uma luz vermelha de pouca intensidade.

2.11 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão. Para montagem da curva foram utilizadas amostras de 0 (branco), 5, 10, 15, 20, 25, e 30µg de BSA em duplicata e adicionou-se água mili-Q para um volume final de 100µl em cada amostra. Em cada tubo foi então adicionado 3ml de solução de Bradford e após um intervalo de 2 minutos as amostras foram lidas no espectrofotômetro a 595nm. Foi feita uma média (X) do valor lido de cada duplicata e dessa média retirou-se o valor de leitura do branco (somente água e Bradford). Da amostra a ser quantificada foram utilizados 10 a 50µl em duplicata e adicionada água mili-Q para 100µl e 3ml de reagente de Bradford em cada tubo. Da média das duplicatas retirou-se o valor da leitura do branco, sendo utilizado como branco o tampão de eluição da coluna na mesma quantidade da amostra (10 a 50µl). Para montagem da curva padrão de BSA, os valores de X - branco foram considerados como valores do eixo Y e a quantidade de proteína utilizada como valores do eixo X. Determinada a curva, pôde-se então calcular a concentração de proteínas contida na amostra através de regressão linear dos valores obtidos na curva.

2.12 - CLIVAGEM COM FATOR XA

As amostras de proteína de fusão clivadas por fator Xa foram cedidas pelo Dr S. King da University of Connecticut Health Center, Farming, Connecticut.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 - PURIFICAÇÃO PLASMIDIAL

A purificação plasmidial foi realizada conforme materiais e métodos pelo Quiagen Plasmid Kit. e como confirmado pelo gel de agarose 1% (figura 3), o plasmídeo pMalc2 que possui 6.145 pares de base (New England Biolabs) e mais 273 pares de bases (91 resíduos) do inserto que codifica a cadeia leve (KING AND PATEL-KING, 1995) aparece nas formas circular e superhelicoidal nas amostras de sobrenadante, eluído e de DNA concentrado. A purificação plasmidial através do Kit Quiagem proporcionou um método prático e eficiente para obtenção do DNA plasmidial contendo o vetor pmalc² que pode agora ser utilizado em vários procedimentos experimentais como digestão com enzimas de restrição para constatação do vetor e para novas transformações em cepas de bactérias.

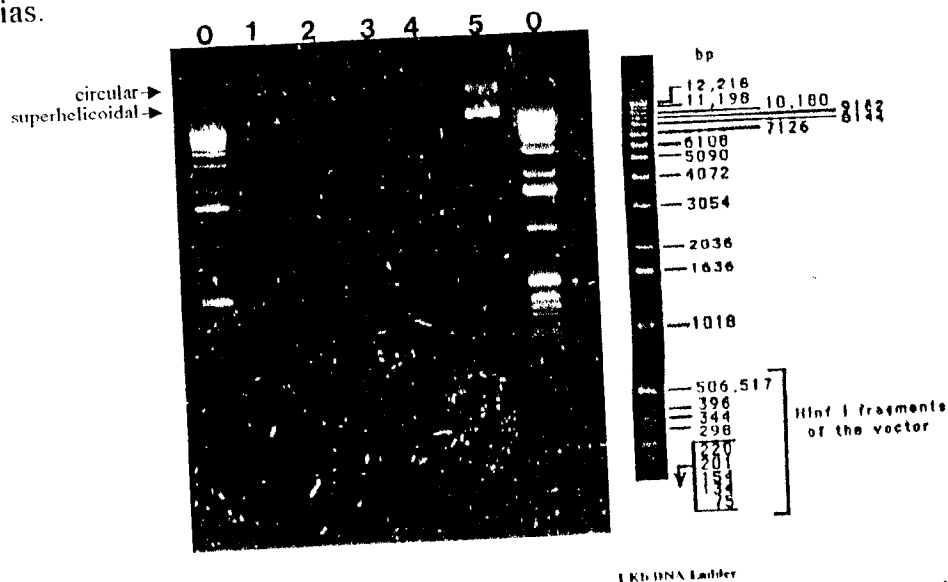


Figura 3 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo resultante do experimento de purificação plasmidial pelo Quiagen. As raias 0 mostram o padrão de peso molecular 1kb *Ladder*; raia 1: sobrenadante aplicado á coluna; raia 2: void; raia 3: lavado e raia 4: eluído. A raia 5 mostra o DNA eluído concentrado conforme descrito em material e métodos páginas 11 e 12. As setas mostram o DNA plasmidial nas formas circular e helicoidal. À direita do gel tem-se o padrão de peso molecular utilizado e suas possíveis migrações com o peso molecular esperado de cada uma.

3.2 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO E DA PLM

Com relação à expressão da proteína de fusão e da PLM sozinha, foi observado comparando-se as amostras de células induzidas e não induzidas, (figura 4) que foram obtidos altos níveis de expressão e não houve expressão significativa antes da adição do indutor IPTG. O vetor *pmal-c²* (figura 5) contém um controle de transcrição gênica (*Operon lac*) onde o promotor *P_{tac}* está posicionado para transcrever os genes *malE* (o qual codifica a proteína ligante de maltose) e *lacZ*. O gene *lacI* codifica o *lac* repressor que desliga a transcrição do *P_{tac}* (Ver figura 6) O IPTG é um indutor não metabolizável deste operon, impedindo a ligação/interação do repressor *lac* com *P_{tac}*, fazendo com que os genes *malE/lacZ* sejam transcritos, ocorrendo então a expressão da proteína de fusão (figura).

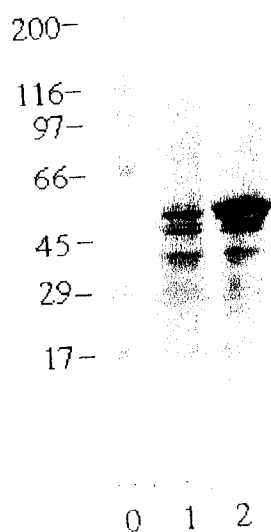
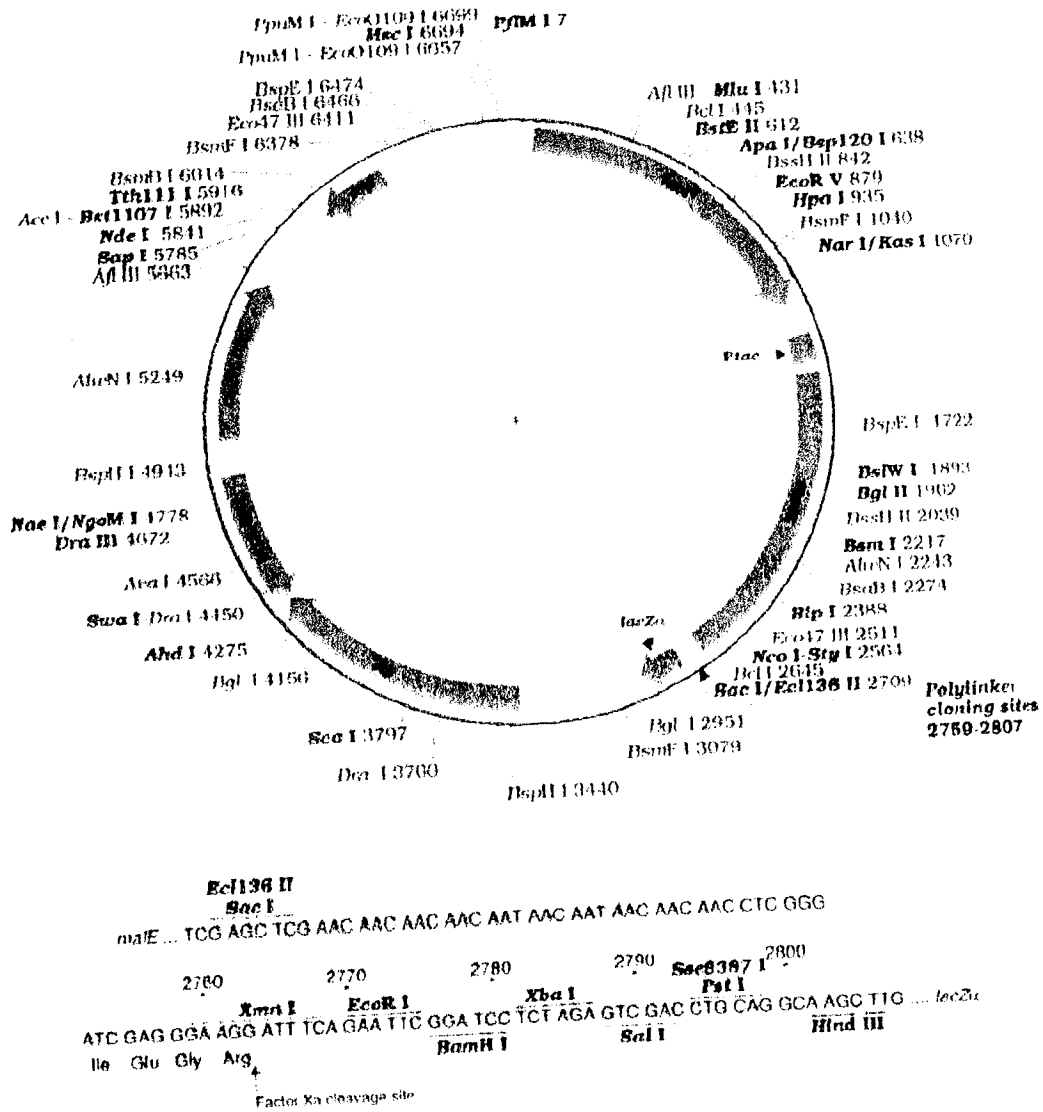


Figura 4 – Expressão da proteína ligante de maltose . Em 0, padrão de peso molecular SDS-611, em 1, células não induzidas e em 2 células induzidas por 2 horas.



References

1. Guan, C. L., P. Jiggs, P. D. and Inoué, H. (1987) *Gene* 67, 21-30
2. Maiza, C. V. et al (1986) *Gene* 74, 365-373
3. Jiggs, P., in Ausubel, F. M. et al (eds) *Current Prot. in Molecular Biol.* (1992) Greene Associates, Wiley-Interscience, New York
4. Zagursky, R. J. and Burman, M. L. (1984) *Gene* 27, 181-191

Figura 5 - Plasmídeo vetor pMALc²

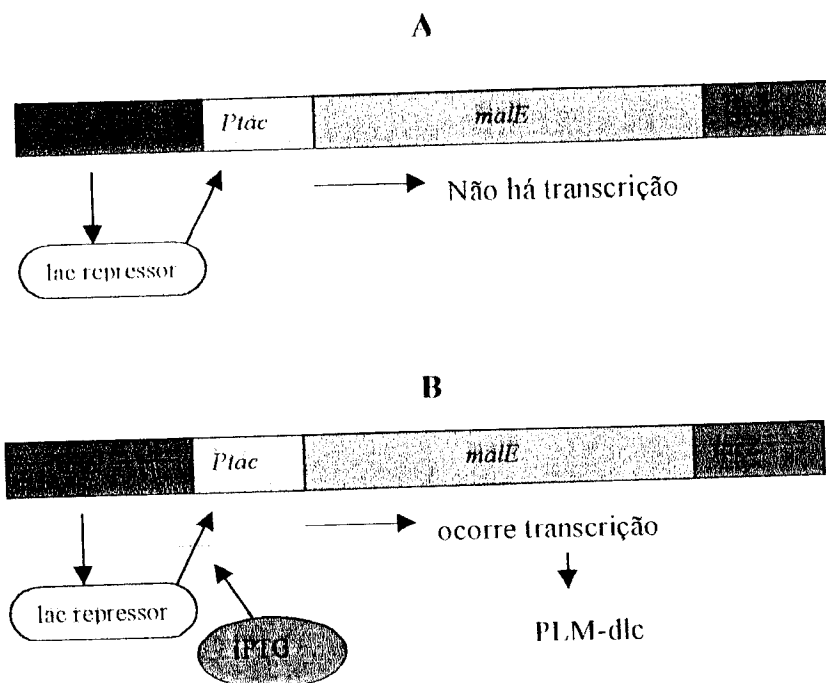


Figura 6 - Ação do IPTG na transcrição gênica. Em **A**: o gene *lacI* codifica o *lac* repressor que desliga a transcrição do *Ptac* responsável pela transcrição dos genes *malE* e *LacZ*. Em **B**: O IPTG impede a interação do *lacI* ao promotor *Ptac* fazendo com que os genes *malE/lacZ* sejam transcritos, ocorrendo então a expressão da PLM-dlc.

Analisando as amostras de precipitado e sobrenadante, o grau de solubilização da proteína de fusão foi considerado muito bom comparado com a quantidade de proteína expressa (figura 7). O alto grau de solubilização encontrado se deve principalmente ao uso do Sarcosil utilizado após a lise das células, diferentemente de outros protocolos de extração. Evidências bioquímicas indicaram que a ocorrência de insolubilidade de proteínas expressas é devido a uma coagregação com outros componentes da membrana, uma interação que pode ocorrer durante a lise, e o uso do Sarcosil tem garantido a solubilidade das proteínas expressas.

Em relação à PLM, primeiro foi utilizado um protocolo de solubilização diferente do protocolo para a proteína de fusão pois, esta proteína é mais solúvel, no entanto, não houve solubilização, então o mesmo protocolo de proteína de fusão foi

utilizado, mesmo assim, o grau de solubilização foi considerado muito baixo em relação à quantidade de proteína expressa. Mas torna-se difícil de analisar este experimento porque o número de purificações da PLM foram insuficientes para se concluir se o tampão de lise utilizado que não foi eficiente ou se não houve lise das células com o sonicador utilizado.

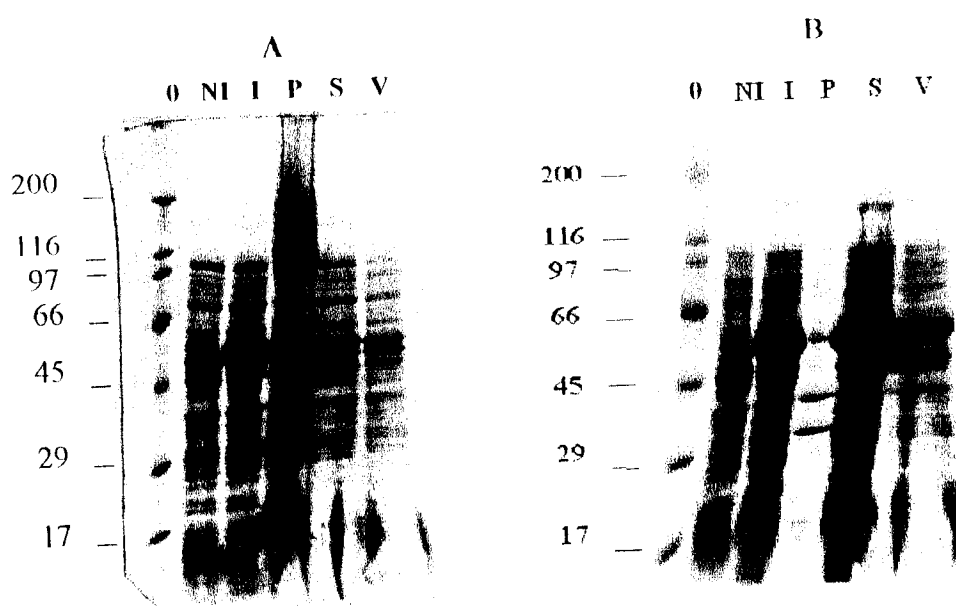


Figura 7 - Em **A** expressão e solubilização da proteína ligante de maltose. Em **B** expressão e solubilização da proteína de fusão PLM-dlc. As amostras **0** correspondem ao padrão de peso molecular SDS 6H; **NI** células não induzidas; **I** células induzidas por 2h; **P** precipitado; **S** sobrenadante e **V** void.

A purificação das proteínas de fusão e da PLM sozinha foi realizada com coluna de afinidade amilose-sepharose. O perfil cromatográfico analisado em espectrofotômetro a 280nm (figura 8 **A**) mostrou um pico de absorbância logo nos primeiros tubos seguido de uma contínua diminuição da quantidade de proteínas até o tubo 6 e se mantém constante até o final da eluição. O perfil cromatográfico analisado por eletroforese confirma o pico de proteínas dos tubos 2, 3 e 4 (figura 8 **B**). Apesar do volume do sobrenadante obtido na expressão ser de 100 ml, apenas 20 a 40 ml foram

aplicados na coluna com um volume de aproximadamente 4 ml, devido à alta probabilidade de saturação da coluna, mesmo assim houve saturação confirmada pelas amostras de void. Mas a purificação foi eficiente como mostra as amostras 1 a 9 da purificação apresentando frações concentradas (tubos 4,5 e 6) contendo PLM-dlc com alto grau de pureza, pois não se observa nenhuma banda a mais no gel, nem mesmo de degradação.

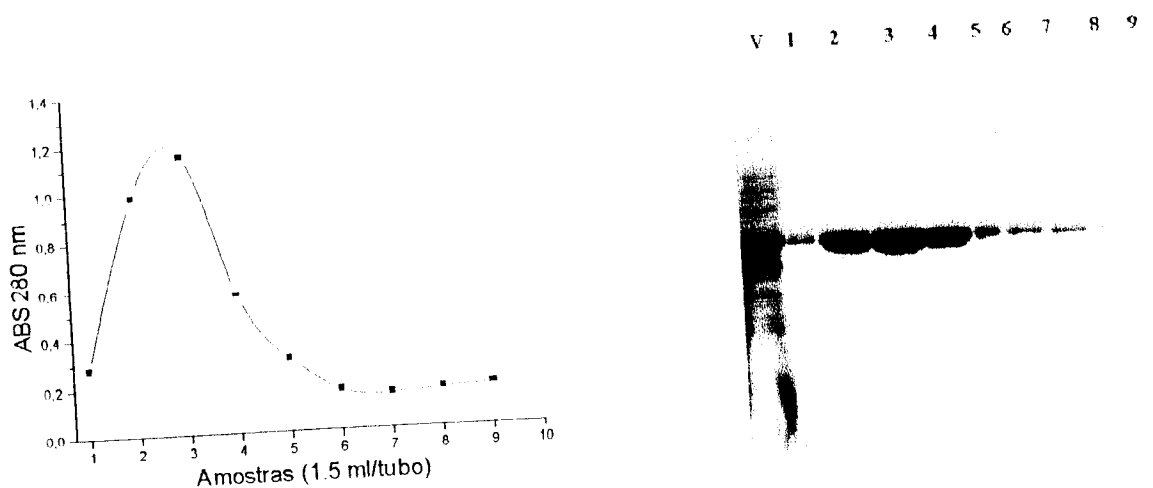


Figura 8 – Em **A** perfil cromatográfico das frações eluídas da coluna da amilose sepharose durante a purificação da proteína de fusão. Em **B** gel de poli-acrilamida 5 a 24% corado com coomassie blue com amostras de: v- void; 1 a 9 amostras eluídas da coluna de amilose sepharose.

O perfil cromatográfico analisado em espectrofotômetro a 280nm referente à purificação da PLM (figura 9 **A**) mostra um pico de proteínas (tubos 2 a 5) e uma diminuição da quantidade de proteínas até o final da eluição. A análise da purificação em eletroforese (figura 9 **B**) confirma uma maior quantidade de PLM nos tubos 2 a 5, mesmo assim foi possível obter frações purificadas e também se observa bandas menores que podem ser degradação e uma banda contaminante acima.

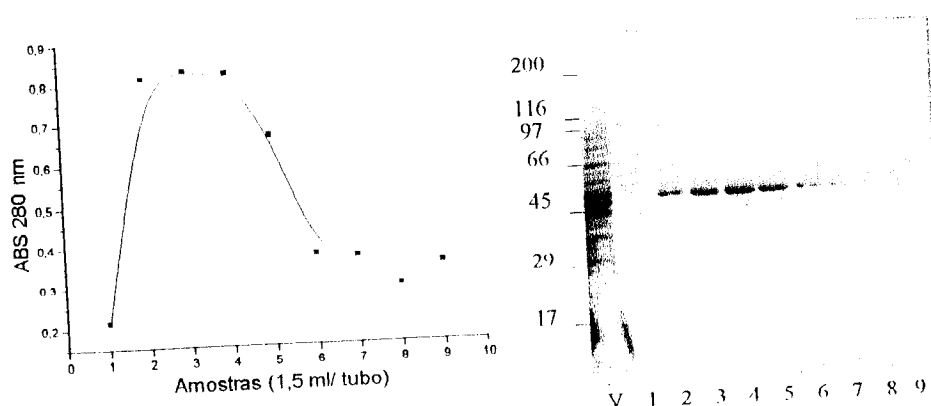


Figura 9 – Em **A** perfil cromatográfico das frações eluídas da coluna de amilose sepharose durante a purificação da proteína ligante de maltose; em **B** gel de poliacrilamida 5 a 24% corado com coomassie blue com amostras de: v- void; 1 a 9 amostras eluídas da coluna de amilose sepharose.

A proteína de fusão migra a um peso molecular esperado entre 45 e 66 kDa, (figura 10) pois a PLM possui uma massa molecular estimada de 42,469 Da, e em adição a 10,3 kDa da cadeia leve de dineína resulta numa proteína de fusão de massa calculada de 52,773Da. A PLM migra com um polipeptídeo maior que 42kDa, devido ao fragmento alfa da β -galactosidase expresso em seu carboxi terminal. A amostra de proteína de fusão clivada por fator Xa mostra um fragmento migrando a 42 kDa que corresponde à proteína ligante de maltose e outros menores de 17 kDa que correspondem à cadeia leve de dineína.

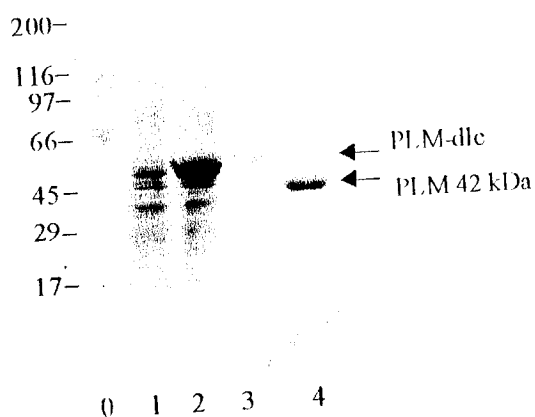


Figura 10 – gel de poliacrilamida 5 a 24% contendo em **0** padrão de peso molecular; em **1** células não induzidas de PLM; em **2** células induzidas; em **3** amostra de proteína de fusão PLM-dlc; em **4** proteína de fusão clivada por fator Xa.

Após a purificação as frações eluídas que continham mais proteínas, confirmadas por SDS PAGE, foram agrupadas e dialisadas em tampão PBS 10x concentrado (Na_2PO_2 0,3% , Na_2HPO_4 1%, NaCl 8%), dosadas pelo método de BRADFORD (1976), segundo Materiais e Métodos (figura 11), e aliqotadas em eppendorfs contendo 100 μg de proteína purificada num volume de 200 μl cada eppendorf e congelados a -20°C . Essas aliqotas foram utilizadas para produção de anticorpos.

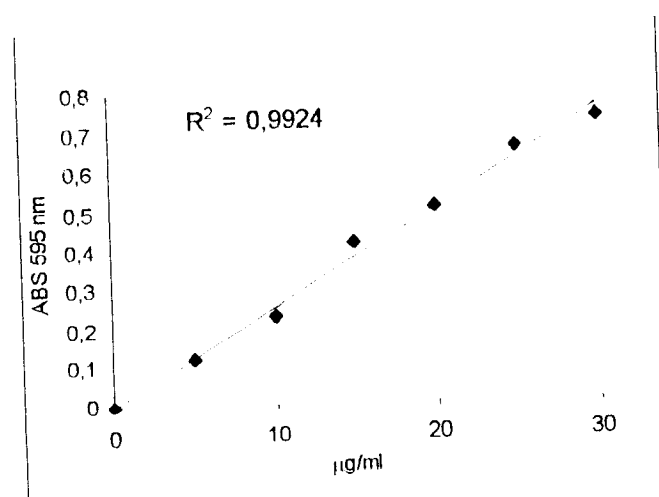


Figura 11 – Curva padrão de soroalbumina bovina (BSA).

3.3 - TRANSFERÊNCIA E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Para otimizar a detecção, as polipeptídeos precisam ser transferidas com eficiência para a membrana. Os protocolos de transferência garantem uma boa eficiência em migrações que ocorrem a 60 V durante 90 minutos para polipeptídeos de até mais de 100kDa, já maiores massas precisam de mais tempo. Estes dados são contrastantes com os obtidos aqui em que polipeptídeos de até mais de 100 kDa, transferidos a 50V, durante a noite, não migraram com eficiência.

O metanol é frequentemente sugerido em transferências de polipeptídeos de baixo peso molecular, pois remove o SDS, aumentando a afinidade dos polipeptídeos com a membrana. Por outro lado, baixas concentrações de SDS (~0,1%) ajudam na

transferência de polipeptídeos de alto peso molecular (>100 kDa), mas podem interferir na ligação destes na membrana.

A eletrotransferência dos polipeptídeos realizada neste trabalho foi considerada insatisfatória, pois os géis de poliacrilamida, após a transferência foram corados e comparados com géis já corados que continham as mesmas amostras aplicadas, e não se encontraram diferenças significativas entre eles, tanto para polipeptídeos de alto peso, como para polipeptídeos de baixo peso molecular. Uma melhor migração dos polipeptídeos de alto peso foi observada em transferência ocorrida a 80 V por 2 horas e meia. Para transferências de polipeptídeos de baixo peso passou-se a usar metanol a 40% no tampão, não apresentando melhor eficiência na migração.

A figura 12 mostra uma transferência ineficaz, na qual compara géis transferidos em tempos diferentes com o gel não transferido contendo as mesmas amostras, podendo-se notar que no gel transferido por meia hora, apenas algumas bandas da fração T11 da purificação de miosina V (cadeias leves) foram transferidas. Mesmo com 3 horas de transferência houve pouca transferência da cadeia leve, além do mais, foi utilizado metanol a 40% no tampão eletroblot, e não foi encontrada uma melhor eficiência na transferência destes polipeptídeos. Tentamos trocar o tampão de transferência utilizado (tris-glicina) para tampão bicarbonato mas, também não houve melhora significativa na migração dos polipeptídeos.

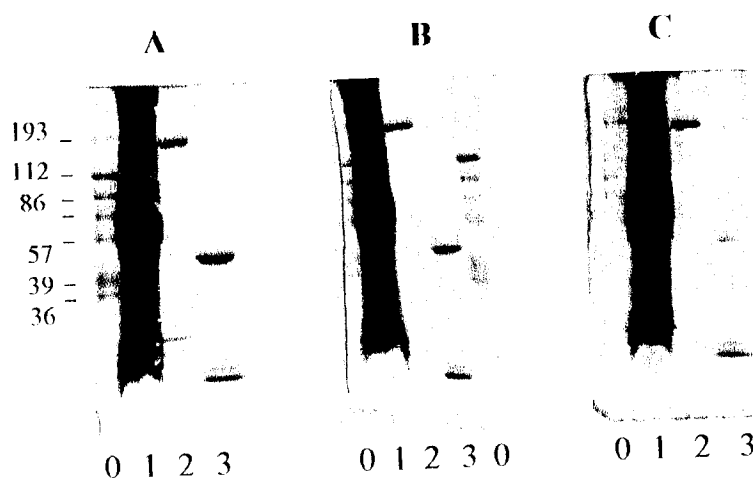


Figura 12 – Géis de poliacrilamida 5 a 24% corados com coomassie blue; em 0 padrão de peso molecular SDS 7B; em 1 homogeneizado de cérebro de rato; em 2 fração T11 de purificação de M-V; em 3 proteína de fusão clivada por fator Xa. Em A gel não transferido corado; em B gel transferido por 30 min. a 35 V; em C gel transferido por 3h a 35V

As transferências de polipeptídeos de baixo peso molecular como a dlc, foram realizadas a 35 V com tempos alternados de até no máximo 60 minutos.

As membranas com dlc e outras cadeias leves de homogeneizado de cérebros, de miosina V clivada por calpaína, tecidos vegetais, etc. Foram incubadas com anticorpo primário anti-dlc R4058, afim de detectar a reação deste anticorpo com a cadeia leve de dineína, e com as outras cadeias leves transferidas.

Ocorreram detecções da dlc em transferências de duração até 30 minutos a 35 V e quando incubadas com R4058 1:1000 durante a noite sob agitação a 4°C (figura 13). Não houve marcações com diluições 1:2000 do anticorpo, ou quando incubadas por menos tempo com o anticorpo. Não ocorreu nenhuma marcação com outras amostras contendo cadeias leves. (figuras 13, 14 e 15)

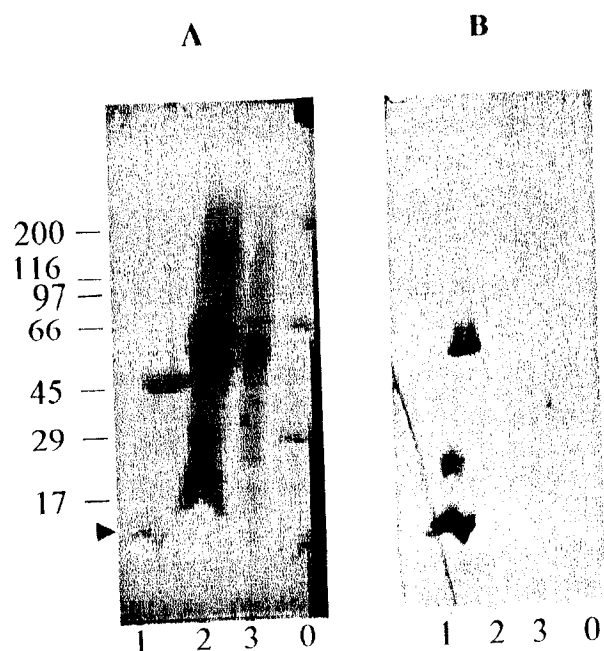


Figura 13 - Detecção da cadeia leve de dineína. **A**: membrana de nitrocelulose transferida por 30 min a 35 V mostrando o padrão de peso molecular SDS-6H (0); amostra de proteína de fusão clivada por fator Xa (1); homogeneizado de cérebro de rato (2); homogeneizado de gânglio de *Apis mellifera*. **B**: filme de raio-X revelado

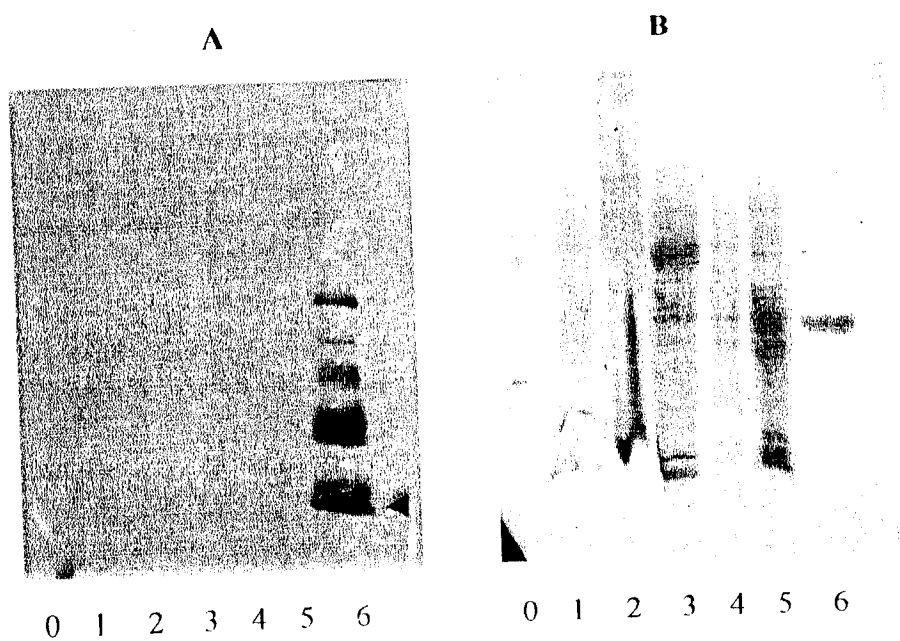


Figura 14 – Em **A** filme de raio-X mostrando detecção da dlc (com anti dlc 1:1000) e também marcações de agregados. Em **B** membrana de PVDf corada com ponceau contendo em **0** padrão de peso molecular SDS 61I, em **1** homogeneizado de cérebro de galinha, em **2** homogeneizado de cérebro de rato, em **3** adrenal bovina, em **4** gânglio de *Apis mellifera*, em **5** homogeneizado de nematóide e em **6** proteína de fusão clivada por fator Xa.

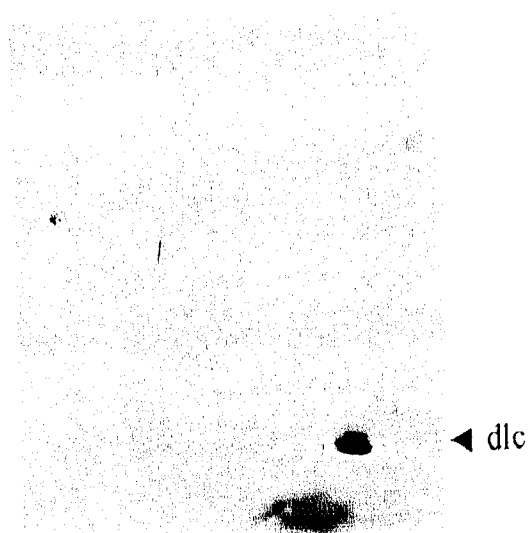


Figura 15 - filme de raio-X mostrando marcação da dlc.

Os polipeptídeos de alto peso molecular também não apresentaram boa eficiência na transferência para a membrana. Geralmente os polipeptídeos de alto peso

molecular como o domínio cabeça de miosina V, foram transferidos a 35 - 50 V durante a noite a 4°C.

As detecções feitas com anti-cabeça de miosina V também não foram satisfatórias, uma das causas seria devido ao fato dos polipeptídeos de alto peso molecular não terem sido transferidos eficientemente para a membrana. As marcações obtidas com o anticorpo anti-cabeça ocorreram utilizando-se o anticorpo diluído 1:2000 e incubado durante a noite. Conseguimos somente uma marcação em que o anticorpo foi incubado por somente uma hora, (gel 8% transferido 80V por 2 horas e meia - figura 17).

A figura 16 mostra a detecção de miosina V em vários tecidos. A membrana foi transferida durante a noite com marcação fraca pelo ponceau dos polipeptídeos de alto peso, no entanto, houve detecção, sugerindo a transferência ineficiente não é a única causa para a não detecção na membrana.

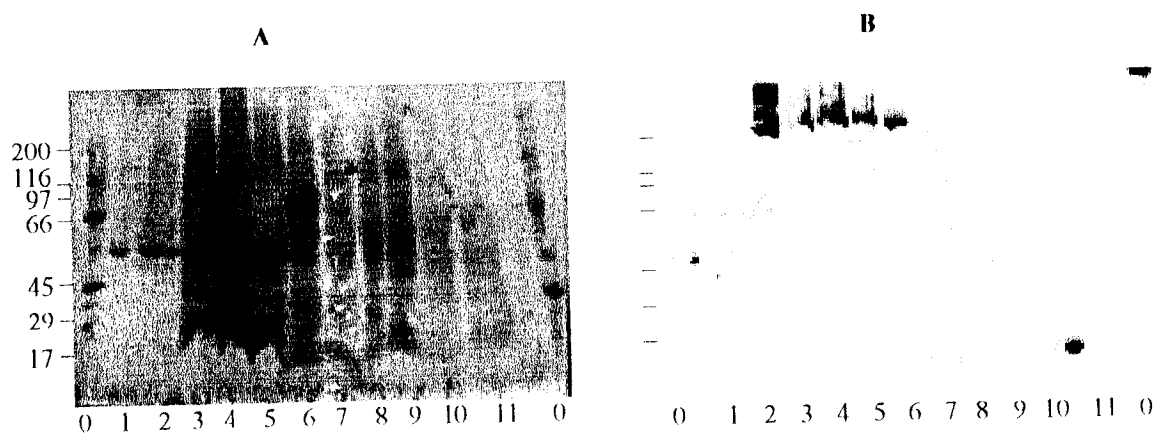


Figura 16 - Teste do anticorpo anti cabeça de miosina V (1:2000). **A**- membrana de nitrocelulose corada com ponceau 0,5% transferida durante a noite, contendo as amostras de: Padrão de peso molecular SDS 6H (0); proteína de fusão PLM-dlc (1); S5 de miosina V(2); homogeneizado de cérebro de porco (3); de cérebro de rato (4), de cérebro de galinha (5); de adrenal bovina (6), de parótida (7). de gânglio de Apis (8); de nematóide (9) de *Vigna* sp Pa 25H (10) e Pa25R (11). **B**- filme de raio-X mostrando a detecção do anticorpo nas amostras de 1 a 6 revelado por 1 minuto.

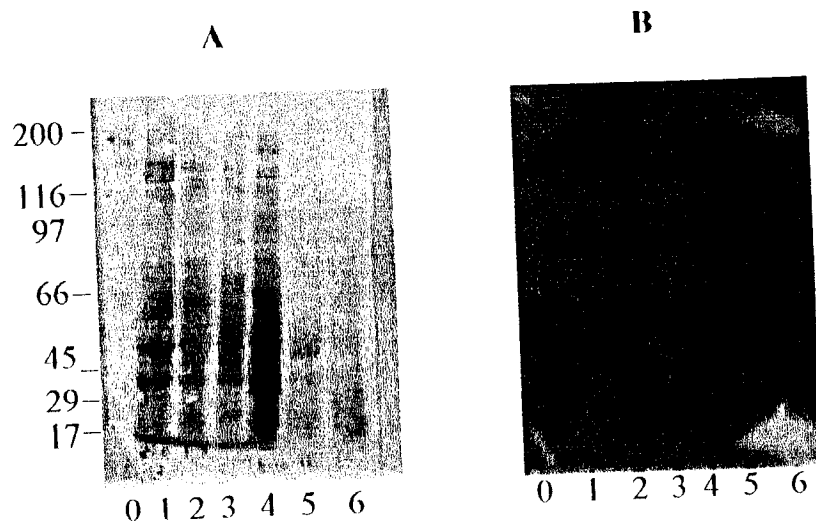


Figura 13 – Detecção com o anti-cabeça de M-V. Em **A** membrana de nitrocelulose corada com ponceau 0,5% transferida por 2,5h a 80V. **0** padrão de peso molecular SDS 6H; **1** amostra de cérebro de galinha; em **2** cérebro de suíno; **3** gânglio de *Apis mellifera*; **4** homogeneizado de nematóide; **5** amostras de *Vigna* PA 25H e **6** PA 25R. Em **B** filme de raio-X com detecção de M-V nas amostras de cérebros de galinha e de porco.

Estes problemas provavelmente ocorreram por uma série de fatores. Primariamente, as polipeptídeos não foram transferidos com eficiência para membrana. O anticorpos primário e secundários podem não estar sendo utilizados na concentração ideal. Outro fator seria quanto à atividade destes anticorpos, levando-se em conta a validade e como estão sendo armazenados. Problemas em relação à revelação pelo método de quimioluminescência também podem ter ocorrido, podendo-se analisar a atividade do reagente de detecção e as formas de armazenamento deste.

4 - CONCLUSÃO

A expressão em bactéria da cadeia leve de dineína é um método experimental prático e simples com a obtenção de quantidades significativas de proteína, propiciando estudos de caracterização da função desta proteína, além de facilitar a produção de anticorpos imuno-específicos a serem usados como sondas de imunodeteção em ensaios de overlay imunoprecipitação.

A abordagem experimental utilizada foi de fundamental importância, pois propiciou a padronização de técnicas de Biologia Molecular, Western Blot e quimioluminescência neste laboratório.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benashski, S.E., Harrison, A., Patel-King, R.S., King, S.M.. 1997 Dimerization of the Highly Conserved Light Chain Shared by Dynein and Myosin V. *J. Biol. Chem.* **33**: 20929-20935.
- Bisario, J. C. S..1997.Caracterização das células de melanomas *dilute* e tipo selvagem e transfecção de cDNAs de miosina-V visando o resgate do fenótipo mutante. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Brennan, J.E, Xia, F., Chao, D.S., Black, S.M., Bredt, D.S., 1997 Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase through Alternative Transcripts, *Dev Neurosci.* **19**: 224-231
- Celis, J.E.; Lauridsen J.B.; Basse.B.,1994. Determination of Antibody by Western Blotting and Immunoprecipitation *Cell Biology A Laboratory Handbook.* **2** 305-311.
- Cheney, R.E. & Mooseker, M.S. 1992. Unconventional myosins. *Curr Op. Cell. Biol.* **4**: 27-35.
- Cheney, R.E, O'Shea M.K, Heuser J.E, Coelho M.V, Wolenski J.S, *et al.*. 1993 Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* **75**:13-23.
- Crépiex, P., Kwon, H., Nicole, L. Spencer, W., Richard, S., Lin, R., Hiscott, J..1997. I κ B α Physically Interacts with a Cytoskeleton-Associated Protein through Its Signal Response Domain. *Mol. Cell. Biol.*.v.17, **12**: 7375-7385.
- Dick^a, T.; Ray, K.; Salz, H.K and Chia, W. 1996. Cytoplasmic dynein (*ddlc1*) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **16**:1966-1977.
- Dick^b, T., Surana, U., Chia, W..1996. Molecular and genetic characterization of SLC1, a putative *Saccharomyces cerevisiae* homolog of metazoan cytoplasmic dynein light chain 1. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 38-43.
- Engle, L.J., & Kennett, R.H.. 1994. Cloning, analysis and chromosomal localization of myoxn (MYH12), the human homolog to the mouse *dilute* gene. *Genomics.* **19**:407-416.
- Espindola, F.S., Espreafico, E. M., Coelho, M.V., Martins, A.R., Costa, F.R., Mooseker, M.S. and Larson, R.E. 1992. Biochemical and immunological characterization of

p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin binding myosin.
J. Cell Biol. 118:359-368

Espindola, F.S.; Suter, D.M.; Lin, C-H; Forscher, P. and Mooseker, M.S. 1996
Localization of unconventional myosins V and VI in neurons. *Molecular Biology of the
Cell (supplement)* 7:372^a

Espresafico, E.M., Cheney, R.E., Matteoli, M., Nascimento, A.A.C., De Camilli,
P.V., Larson, R.E. and Mooseker, M.S.. 1992. Primary structure and cellular
localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with
calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* 119:1541-58

Frankel, S., Sohn, R. and Leinwand, L.. 1991. The use of sarkosyl in generating soluble
protein after bacterial expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1192-1196

Greenwood, M.T, Guo, Y., Kumar, U., Bearuséjours, S., Hussain, S.N.A. 1997 distributon
of Protein Inhbtor of Neuronal Nitrc Oxide Synthase in Rat Brain. *Biochemical and
Biophysical research communications.* 238:617-621.

Gillardon, F., Krep, H., Brnker, G., Lenz, C., Bottiger, B., Hossmann, K.A.. 1998.
Induction of protein inhibitor of neuronal nitric oxide syntase/cytoplasmic dynein light
chain folowing cerebral schemia. *Neuroscience.* 84(1):81-88.

Haarer, B.K., Petzold, A.S., Lillie, S.H., and Brown, S.S.. 1994. Identification of MYO4,
a second class V myosin gene in yeast. *J. Cell. Sci.* 107:1055-1064.

Hasson, T., & Mooseker, M. S. 1996. Vertebrate Unconventional Myosins *The J. Biol.
Chem.* 271, 16431-16434.

Hitokawa, N., 1998. Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of
Organelle Transport. *Science.* 279:

Hiscott, J., Beauparlant, P., Crepieux, P., DeLuca, C., Kwon, R.L., Petropoulos, L.. 1997.
Cellular and viral protein interations regulating IκBα during retrovirus infection.
Journal of Leukocyte Biology. 62:82-92.

Holzbaur, E. L. F. and Vallee, R. B.. 1994. Dyneins: Molecular structure and cellular
function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10:339-72.

Jaffrey, S.R., Snyder, S.H.. 1996. Pin: An Associate Proten Inhibitor of Neuronal Nitric
Oxide Synthase. *Science.* 274:774-777.

- Johnston, G. C., Prendergast, J. A., and Singer, R. A. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* *MYO2* gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* 113, 539-551
- King, S.M.; Barbarese, E.; Dilman, J.; Patel-King, R.; Carson, J.H.; Pfister, K.K. 1996. Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr8000 light chain. *J. Biol. Chem.* 271: 19358-19366.
- King, S.M.; & Patel-King, R.S. 1995. The Mr=8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *chlamydomonas* flagella have cytoplasmic homologues. *J. Biol. Chem.* 270, 11445- 11452.
- Langford, G.M., 1995, Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems, *Cell biology*, 7:82-88.
- Larson, R. E. 1996 . Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 309-318.
- Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1991) Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature* 349: 709-713; and 352:347.
- Mooseker, M. S. & Cheney, R. E. 1995. Unconventional myosins. *Ann.Rev. Cell. Dev. Biol.* 11, 633-75.
- Natan, C. & Xie, Q.W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Cell Chem.* 269:13275-13278.
- Olmsted, J.B.. 1986. Microtubule-Associated Proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2:421-457.
- Paschal, B.M. & Vallee, R.B. 1987. Retrograde transport by microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330:181-3.
- Phillis, R.; Statton, D.; Caruccio, P. and Murphey, R.K. 1996. Mutations in the 8kDa dynein light chain gene disrupt sensory axon projections in the *Drosophila* imaginal CNS. *Development* 122, 2955-2963.
- Rosenberg, I.M..1996. Protein analyses and purification. Bencotop Techniques. Birkäuseur.153-182.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.

- Vallee, R.. 1993. Molecular analysis of the microtubule motor dynien. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8769-8772.
- Warrick, H.M. & Spudich, J.A. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 379-421.
- Wolf, G..1997. Nitric oxide and oxide nitric sintase: Biology, pathology, localization. *Histol. Histopathol.*12:251-256.
- Zhao, L.P., Koslovsky, J.S., Reinhard, J., Bähler, M., Witt, A.E., Provance, D.W.and Mercer, J.A.. 1996. Cloning and characterization of myr6, an inconvencional. myosin of the dilute/myosin-V family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:10826-10831.